76　消化管癌に対する癌免疫複合療法開発と分子機序解明	坂口　善久

【目的】各癌腫、特に消化管癌における標準治療と免疫チェックポイント阻害剤の併用効果に関する知見はほとんどないのが現状である。大腸癌では、マイクロサテライト不安定性（microsatellite instability, MSI）を高頻度に認める症例（MSI-H）に免疫チェックポイント阻害剤が有効であることが報告されている。しかし、免疫チェックポイント阻害剤にどのような種類の細胞が応答しているか特定できていない。

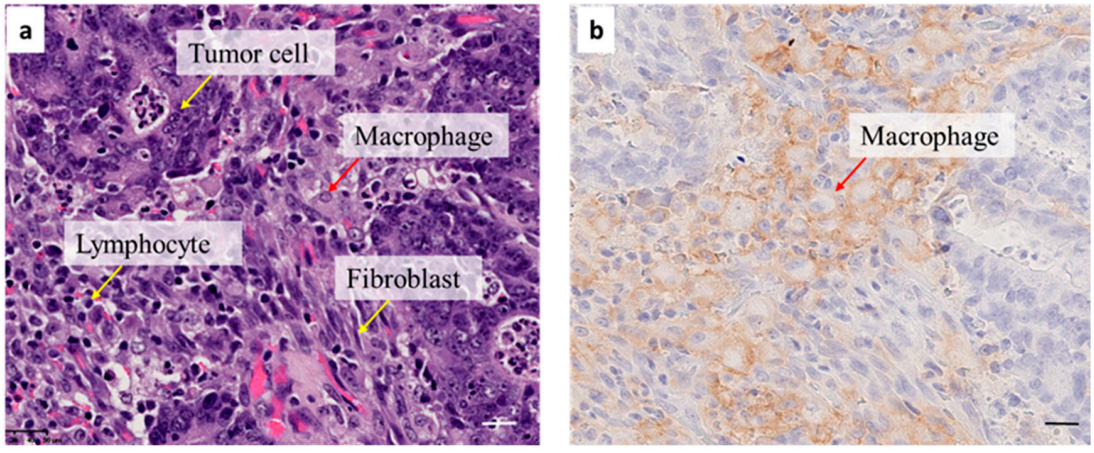
今回、我々は腫瘍先進部における免疫微小環境を解析するため、MSI-H およびマイクロサテライト不安定性のない（MSS）大腸癌症例における programmed cell death-ligand 1（PD-L1）と関連タンパクの発現を評価し、奏効性の高い免疫複合療法開発のためのエビデンス構築を目指した。

【方法】当科で外科的切除を施行した大腸癌 499 例を対象に MSI ステータスを解析した。499 例中 48 例が MSI-H であった。プロペンシティスコアマッチングを行い、組織学検討が可能であった MSI-H 36 例、MSS 37 例を対象に免疫組織化学染色を行い、PD-L1、PD-1、CD8 陽性 T リンパ球、CD68 陽性マクロファージの発現を評価した。PD-L1 は腫瘍細胞における発現（PD-L1[T]）、骨髄由来の免疫系細胞における発現（PD-L1[I]）に分けて評価した。

【結果】MSI-H 症例で PD-L1（T）陽性を 36.1%、PD-L1（I）陽性を 72.2%、MSS 症例で PD-L1（T）陽性を 5.4%、PD-L1（I）陽性を 27%に認めた。MSI-H 症例では、PD-L1（T）は低分化腺癌、リンパ管侵襲、脈管侵襲と相関を認めた（$P < 0.05$）。また、PD-L1（I）は pStage Ⅰ/Ⅱ、budding grade2/3 と相関を認めた（$P < 0.05$）。MSI-H 症例では、腫瘍中心部に比較して腫瘍先進部の免疫系細胞に多く PD-L1 が発現していた（$P < 0.005$）。CD8・CD68 陽性細胞も腫瘍先進部に多数浸潤していた（$P < 0.005$）。

MSI-H 大腸癌の腫瘍先進部における腫瘍進展と免疫回避に PD-L1 陽性の腫瘍細胞とマクロファージが関与していることが示唆された。これらの結果は MSI-H および MSS 大腸癌に対する有効な標準治療と免疫チェックポイント阻害剤の複合併用療法開発の手がかりとなる可能性がある。

MSI-H 大腸癌症例の腫瘍先進部における PD-L1 の免疫組織化学染色像



（bars: 100μm）

76. 消化管癌に対する癌免疫複合療法開発と分子機序解明

坂口　善久

国立病院機構 九州医療センター 消化管外科

Key words：PD-L1，MSI-H，大腸癌，免疫チェックポイント阻害剤，マクロファージ

緒　言

進行または再発消化管癌の治療成績向上のためには、手術療法に加え化学療法・放射線療法を含めた集学的治療のさらなる発展が望まれているところである。腫瘍免疫応答を利用した治療法は個体の能動的治癒力による悪性腫瘍の根絶に威力を発揮する新たな modality として期待される。動物実験によって抗腫瘍免疫応答が既存の癌集学的治療に関与することを示唆する報告はみられるものの、実際の臨床例においては、多岐に亘る腫瘍内浸潤リンパ球の種類や腫瘍独自の局所環境の差違によって治療効果と臨床病理学的因子、予後との関連を明らかにすることは容易ではない。

免疫チェックポイント阻害剤は、生体内で過剰な免疫応答を抑制する T 細胞の抑制分子である cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4（CTLA-4）と自己の細胞への過剰な応答を抑制する programmed cell death-1（PD-1）ligand（PD-L1、2）による抑制シグナルおよび PD-1 分子に作用して腫瘍局所での腫瘍免疫応答の抑制、T 細胞の疲弊化を惹起する因子であり、近年癌治療の形を大きく変貌させている。PD-1 ligand はヒト癌組織に発現し、様々な癌腫でその発現と予後との間に負の相関がある。抗 PD-1 抗体、抗 PD-L1 抗体を用いた多くの臨床試験が行われ腫瘍縮小効果や予後改善効果が報告されている［1〜3］。免疫チェックポイント阻害剤の臨床効果をより発展させるためには、奏効性の高い癌集学的治療と免疫チェックポイント阻害剤との併用療法（癌免疫複合療法）の開発が望まれるが、これまで消化管癌において標準治療との複合療法に関する知見はほとんどないのが現状である。

一般的に消化管癌、特に大腸癌は抗 PD-1/抗 PD-L1 抗体療法の奏効率が非常に低い癌種であるが、ミスマッチ修復機能が欠損しているあるいはマイクロサテライト不安定性（MSI）を示す（MSI-H）大腸癌では有効であることが知られている［4］。MSI-H 大腸癌では異常なペプチド（neopeptide）が産生され多数のリンパ球が腫瘍内に浸潤し、抗 PD-1/抗 PD-L1 抗体が奏効すると考えられているが、これらの治療標的となる細胞群はいまだに特定できていない。

本研究の目的は、消化管癌、特に大腸癌において、これら免疫チェックポイント阻害剤の治療標的となる細胞群と腫瘍先進部において免疫回避に関与している細胞群を選別し、より効果的な癌免疫複合療法の開発を目指すための基礎的なエビデンスを構築することである。

方　法

1. 対象

1994 年 1 月から 2015 年 12 月の期間に術前無治療で外科的切除を施行された 499 例の大腸癌を対象とした。組織学的診断は 2015 年 WHO 分類に、また病理学的ステージ分類は UICC-TNM 分類第 8 版に準拠した。収集した患者情報は、①性別　②手術時の年齢　③腫瘍の部位（右側大腸/左側大腸）　④組織型　⑤病理学的壁深達度　⑥リンパ節転移　⑦リンパ管侵襲　⑧脈管侵襲　⑨病理学的ステージ分類　⑩全生存率である。

全生存率に影響している因子を多重ロジスティック回帰分析により抽出した。

2. MSI 解析と症例の選択

MSI ステータスは蛍光標識したプライマーと自動 DNA シーケンサーを用いて解析した［5］。PCR 法を用いて腫瘍組織と正常組織におけるマイクロサテライト領域を増幅させた。蛍光標識した PCR 産物を ABI 310 シーケンサー（Applied Biosystems, Foster City, CA, USA）にロードし、GeneScan software （Thermo Fisher Scientific, Waltham,

MA, USA）で解析を行った。MSI は 5 つのマーカー（D2S123,D5S107,D10S197,D11S904,D13S175）で判定した。MSI 陽性が 2 つ以上のマーカーで認められる場合を MSI-H,1 つのマーカーでのみ認められる場合を MSI-L,いずれのマーカーにおいても認められない場合を MSS と判定した。本研究では MSS と MSI-L を MSS 群と定義した。MSI ステータスを全 499 例で解析した。48 例が MSI-H 群,451 例が MSS 群であった。全生存率に影響している 2 つの因子（年齢と病理学的ステージ分類）でプロペンシティスコアマッチングを行い、各群 46 例ずつ症例を選択した。最終的に組織学検討が可能であった MSI-H 36 症例、MSS 37 症例で検討を行った。

3. 免疫組織化学染色と染色の評価

免疫組織化学染色（IHC）には厚さ 4μmのホルマリン固定、パラフィン包埋切片を使用した。実験には以下の市販の抗体を使用した。

PD-L1: clone SP142, 希釈率 100 倍、Spring Bioscience, Pleasanton, CA, USA

PD-1：clone D4W2J, 希釈率 200 倍、Cell Signaling Technology, MA, USA

CD8：clone CD8/144B, 希釈率 100 倍、Dako, Carpinteria, CA, USA

CD68：clone KP1, 希釈率 400 倍、Dako, Carpinteria, CA, USA

染色切片は 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride solution（DAB）で 3～4 分間発色した。マイヤーヘマトキシリンで対比染色を行い脱水後、カバーグラスで封入した。

本研究における PD-L1 発現の評価基準を以下に示した。

(1) 腫瘍細胞の 1%以上が染色された症例を PD-L1（T）陽性と判定した。

(2) 腫瘍に浸潤する骨髄由来の免疫細胞の 1%以上が染色された症例を PD-L1（I）陽性と判定した。

我々は顕微鏡で観察した範囲中の PD-L1 陽性細胞の割合を評価し、ヒストグラムを作成した。さらに、腫瘍内の PD-L1 陽性細胞の局在を明らかにするために、腫瘍中心部と腫瘍先進部でそれぞれ PD-L1 陽性細胞数を測定した。顕微鏡の 400 倍の拡大視野で偏りのないようランダムに 3-5 視野を確保し、評価した。PD-L1、CD8、CD68 は各視野の陽性細胞数の平均値を算出し細胞密度を測定した。

4. 統計学的解析

多重ロジスティック回帰分析とプロペンシティスコアマッチングは SAS software version 9.3（SAS Institute, Cary, NC, USA）で行った。臨床病理学的因子と PD-L1 発現の相関はカイ二乗検定と Fisher の正確検定を用いて解析した。PD-L1、PD-1、CD8、CD68 陽性細胞は Student-t 検定を用いて解析した。P 値 <0.05 を統計学的有意とした。これらの解析は JMP13.0 software（SAS Institute、Cary、NC、USA）で行った。

結　果

1. MSI-H および MSS 大腸癌における PD-L1 発現と臨床病理学的因子の相関

MSI-H 大腸癌 36 例、MSS 大腸癌 37 例の検討から、MSI-H 群は MSS 群に比べて低分化型腺癌、右側大腸腫瘍が多かった（各々$P<0.001$、$P<0.01$）。既報と同様［6］、PD-L1 は腫瘍細胞および間質の骨髄由来の免疫細胞（マクロファージ、リンパ球、樹状細胞）に発現していた。MSI-H 群は MSS 群に比べて PD-L1 陽性細胞の割合が有意に高値であった（12.2% vs 1.8% : $P<0.001$）。MSI-H 群で PD-L1（T）陽性を 13/36（36.1%）、MSS 群で PD-L1（T）陽性を 2/37（5.4%）に認めた。MSI-H 群で、PD-L1（T）は低分化腺癌、リンパ管侵襲、脈管侵襲と相関を認めた（$P=0.049$、$P=0.049$、$P=0,03$）。MSI-H 群で PD-L1（I）陽性を 26/36（72.2%）、MSS 群で PD-L1（I）陽性を 10/37（27%）に認めた。MSI-H 群において PD-L1（I）発現は病理学的ステージⅠ/Ⅱと相関を認めた（$P=0.03$）。さらに budding（簇出）grade と PD-L1 発現の相関関係も解析したところ、SI-H 群において PD-L1（T）陽性は budding grade2/3 と相関関係を認めなかったが、PD-L1（I）陽性は budding grade2/3 と有意な相関関係を認めた（$P=0.043$）（表 1）。

表 1. マイクロサテライト不安定性を示す（MSI-H）大腸癌症例の腫瘍細胞における PD-L1 発現【PD-L1（T）および PD-L1（I）】と臨床病理学的因子の相関

因子		症例数 (n=36)		PD-L1(T)					PD-L1(I)				
				陰性 (n=23)		陽性 (n=13)		P値	陰性 (n=10)		陽性 (n=26)		P値
性別	男性	12	(33.3)	8	(34.8)	4	(30.7)	0.8	4	(40)	8	(30.7)	0.59
	女性	24	(66.7)	15	(65.2)	9	(69.3)		6	(60)	18	(69.3)	
年齢	＜65	13	(36.1)	9	(39.1)	4	(30.7)	0.62	3	(30)	10	(38.5)	0.64
	≧65	23	(63.9)	14	(60.9)	9	(69.3)		7	(70)	16	(61.5)	
腫瘍深達度	m/sm	1	(2.8)	1	(4.3)	0	(0)	0.38	1	(10)	0	(0)	0.0036
	mp/ss	30	(83.3)	20	(87.0)	10	(76.9)		5	(50)	25	(96.2)	
	se(a)/si(ai)	5	(13.9)	2	(8.7)	3	(23.1)		4	(40)	1	(3.8)	
リンパ節転移	n (-)	28	(77.8)	17	(73.9)	11	(84.6)	0.46	7	(70)	21	(80.8)	0.49
	n (+)	8	(22.2)	6	(26.1)	2	(15.4)		3	(30)	5	(19.2)	
組織型	高／中分化	24	(66.7)	18	(78.3)	6	(46.2)	0.049	8	(80)	16	(61.5)	0.29
	低分化	12	(33.3)	5	(21.7)	7	(53.8)		2	(20)	10	(38.5)	
リンパ管侵襲	ly (-)	24	(66.7)	18	(78.3)	6	(46.2)	0.049	8	(80)	16	(61.5)	0.29
	ly (+)	12	(33.3)	5	(21.7)	7	(53.8)		2	(20)	10	(38.5)	
脈管侵襲	v (-)	29	(80.6)	21	(91.4)	8	(61.5)	0.03	7	(70)	22	(84.6)	0.32
	v (+)	7	(19.4)	2	(8.6)	5	(38.5)		3	(30)	4	(15.4)	
腫瘍の部位	右側	28	(77.8)	17	(73.9)	11	(84.6)	0.45	7	(70)	21	(80.8)	0.49
	左側	8	(22.2)	6	(26.1)	2	(15.4)		3	(30)	5	(19.2)	
pStage	I / II	25	(69.4)	15	(65.2)	10	(76.9)	0.46	4	(40)	21	(80.8)	0.017
	III / IV	11	(30.5)	8	(34.8)	3	(23.1)		6	(60	5	(19.2)	
簇出 budding	Grade 1	23	(63.9)	16	(69.5)	7	(53.8)	0.34	9	(90)	14	(53.8)	0.043
	Grade 2/3	13	(36.1)	7	(30.5)	6	(46.2)		1	(10)	12	(46.2)	

m: 粘膜 ; sm: 粘膜下層 ; mp: 固有筋層 ; ss: 漿膜下層 ; se （a）: 漿膜面に露出 ; si （ai）:隣接する臓器に浸潤がある ; pStage: 病理学的ステージ分類 ; （ ）: %

2. PD-L1、PD-1、CD8、CD68 陽性細胞の局在

PD-L1（T）は MSS 群、MSI-H 群においてともに局在を認めなかった。PD-L1（I）、CD8 陽性 T リンパ球、CD68 陽性マクロファージは腫瘍中心部に比べて腫瘍先進部で高発現していた（$P<0.005$、$P<0.005$、$P<0.001$）。PD-1 陽性細胞は局在を認めなかった（MSS 群：$P=0.86$,MSI-H 群:$P=0.41$）。MSI-H 群は MSS 群に比べて腫瘍先進部における PD-L1（I）、PD-1、CD8 陽性細胞の平均値が高かった（$P<0.0001$、$P=0.036$、$P<0.0001$）。MSI-H 症例の腫瘍先進部の染色像を図 1 に示す。PD-L1 と CD68 陽性細胞は腫瘍先進部の間質に発現していた。CD8 陽性 T リンパ球は腫瘍実質および間質に浸潤していた。ヘマトキシリン&エオジン染色の拡大像では、腫瘍細胞、マクロファージ、リンパ球が多数腫瘍先進部に浸潤していた（図 2a）。PD-L1 は主に腫瘍関連マクロファージ（TAMs）に発現していた（図 2b）。

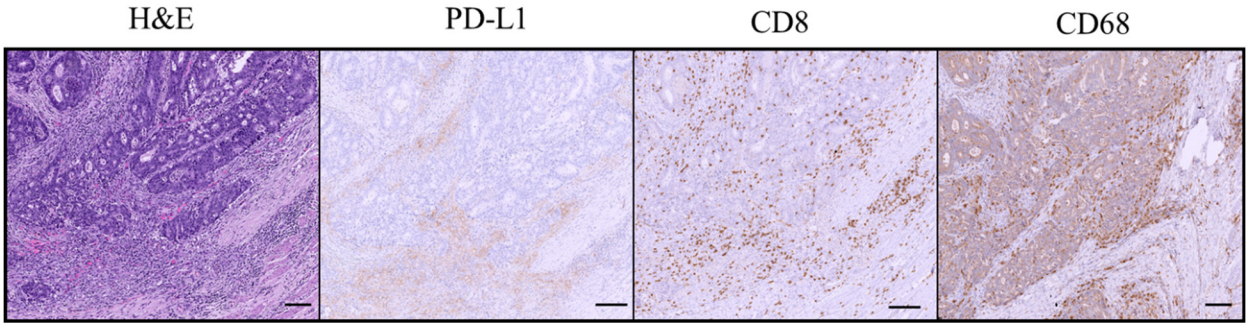


図 1. MSI-H 大腸癌症例の腫瘍先進部における PD-L1、CD8、CD68 の免疫組織化学染色像
PD-L1 と CD68 陽性マクロファージは腫瘍先進部の間質に高発現していた。CD8 陽性 T リンパ球は腫瘍先進部の腫瘍実質および間質に多数浸潤していた。スケールバーは 100 μm。

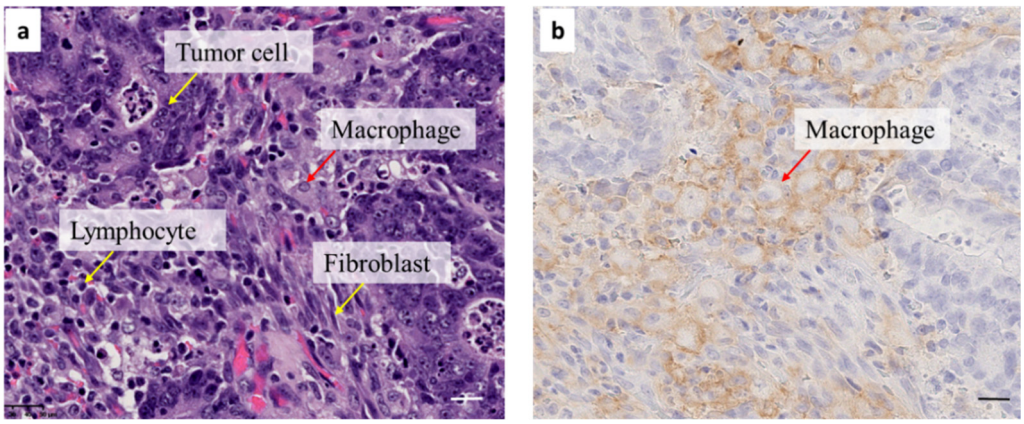


図 2. MSI-H 大腸癌症例の腫瘍先進部における PD-L1 の免疫組織化学染色像（拡大象）
腫瘍先進部の拡大像を示す（a：ヘマトキシリン&エオジン染色、b：PD-L1 免疫染色）。b の赤矢印は PD-L1 陽性マクロファージを示している。スケールバーは 20 μm。

考　察

Llosa らは腫瘍浸潤リンパ球、間質細胞、腫瘍先進部における免疫チェックポイント分子の発現は、腫瘍の免疫回避能力（腫瘍がリンパ球などの宿主の免疫系細胞から攻撃されるのを回避する能力）を表現していると報告している［6］。本研究では MSI-H および MSS 大腸癌の腫瘍細胞と骨髄由来の免疫細胞における PD-L1 発現と臨床病理学的因子の相関および PD-L1、CD8、CD68 陽性細胞の局在を検討し、MSI-H 大腸癌の腫瘍先進部において主にマクロファージに PD-L1 が発現していることを示した。Key findings として以下の 2 点を掲げる。

1　MSI-H 大腸癌の腫瘍細胞における PD-L1 発現は低分化型腺癌、リンパ管侵襲、脈管侵襲と相関を認めた。この結果から PD-L1 を発現している腫瘍細胞は組織学的に悪性度が高いことが示唆された。MSI-H 大腸癌の骨髄由来の免疫系細胞における PD-L1 発現は、pStage Ⅰ/Ⅱおよび budding grade と相関を認め、Stage Ⅰ/Ⅱの MSI-H 大腸癌では腫瘍間質に多数のリンパ球の浸潤を認めた。Prall らは大腸癌における budding は PD-L1 発現と相関があることを報告している［7］。一方、Kim らは、budding が免疫細胞ではなく腫瘍細胞における PD-L1 発現と相関していることを報告しており［8］、免疫系担当細胞における PD-L1 発現と budding との関係は不明確である。Budding は上皮間葉系移行（epithelial mesenchymal transition, EMT）に基づいているとされるが、非小細胞癌、腎癌、乳癌、食道癌における PD-L1 発現を検討したいくつかの study で、EMT が腫瘍細胞における PD-L1 発現を誘導していることが報告されている［9, 10］。EMT と PD-L1 発現誘導の関係については更なる検討を要する。

2　PD-L1 は主に MSI-H 大腸癌の腫瘍先進部の腫瘍の発生や進展の際に重要な役割をする免疫系細胞であるマクロファージに発現していた。マクロファージは activated phenotype（M1 型）,alternatively activated phenotype

（M2 型）の 2 つに区分されている。IL-4、IL-10、IL-13 といった液性因子が単球を M2 型マクロファージに分化させる。M2 型マクロファージは貪食活性が亢進しており、腫瘍の発生にも関与しているとともに、IL-10 やアルギナーゼが高発現し、MHC class Ⅱや IL-12 は低発現している。このことから多くの M2 型マクロファージが腫瘍関連マクロファージ（TAM）と考えられており、腫瘍の血管新生や転移を促進している。蛍光免疫染色法を用いた先行研究では、PD-L1 陽性 M2 型マクロファージは MSI-H 大腸癌の腫瘍先進部に多数浸潤しており、腫瘍先進部の腫瘍細胞と間質の境界部分の M2 型マクロファージのみに PD-L1 が発現していた。一方、境界部から離れた間質では PD-L1 は発現していなかった（データ供覧なし）。このことから PD-L1 陽性の腫瘍細胞と PD-L1 陽性の M2 型マクロファージが MSI-H 大腸癌の腫瘍進展や免疫回避に寄与していると予想された。PD-L1 陽性の腫瘍細胞に加えて PD-L1 陽性 M2 型マクロファージも免疫チェックポイント阻害剤の治療ターゲットとなる可能性が示唆された。

本研究のデータから、MSI-H 大腸癌の腫瘍進展と免疫回避に PD-L1 陽性の腫瘍細胞とマクロファージが関与していることが示唆された。また、さらなる検討によって、腫瘍先進部の PD-L1 陽性 M2 型マクロファージが免疫チェックポイント阻害剤の治療ターゲットとなる可能性があると考えられ、MSI-H および MSS 大腸癌に対する有効な標準治療と免疫チェックポイント阻害剤の複合併用療法開発の手がかりとなる可能性がある。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、九州大学大学院消化器・総合外科准教授の沖英次先生、同講師の佐伯浩司先生および国立病院機構九州医療センター消化管外科・がん臨床研究部長の楠本哲也先生の各位である。

文　献

1） Topalian SL, Sznol M, McDermott DF, Kluger HM, Carvajal RD, Sharfman WH, Brahmer JR, Lawrence DP, Atkins MB, Powderly JD, Leming PD, Lipson EJ, Puzanov I, Smith DC, Taube JM, Wigginton JM, Kollia GD, Gupta A, Pardoll DM, Sosman JA, Hodi FS. Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab. J Clin Oncol 2014; 32: 1020-1030. DOI: 10.1200/JCO.2013.53.0105.

2） Motzer RJ, Rini BI, McDermott DF, Redman BG, Kuzel TM, Harrison MR, Vaishampayan UN, Drabkin HA, George S, Logan TF, Margolin KA, Plimack ER, Lambert AM, Waxman IM, Hammers HJ. Nivolumab for metastatic renal cell carcinoma: results of a randomized phase II trial. J Clin Oncol 2015; 33: 1430-1437. DOI: 10.1200/JCO.2014.59.0703.

3） Link JT, Overman MJ. Immunotherapy progress in mismatch repair-deficient colorectal cancer and future therapeutic challenges. Cancer J 2016; 22: 190-195. DOI: 10.1097/PPO.0000000000000196.

4） Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, Skora AD, Luber BS, Azad NS, Laheru D, Biedrzycki B, Donehower RC, Zaheer A, Fisher GA, Crocenzi TS, Lee JJ, Duffy SM, Goldberg RM, de la Chapelle A, Koshiji M, Bhaijee F, Huebner T, Hruban RH, Wood LD, Cuka N, Pardoll DM, Papadopoulos N, Kinzler KW, Zhou S, Cornish TC, Taube JM, Anders RA, Eshleman JR, Vogelstein B, Diaz LA Jr. PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. N Engl J Med 2015; 372: 2509-2520. DOI: 10.1056/NEJMoa1500596.

5） Oki E, Oda S, Maehara Y, Sugimachi K. Mutated gene-specific phenotypes of dinucleotide repeat instability in human colorectal carcinoma cell lines deficient in DNA mismatch repair. Oncogene 1999; 18: 2143-2147.DOI: 10.1038/sj.onc.1202583.

6） Llosa NJ, Cruise M, Tam A, Wicks EC, Hechenbleikner EM, Taube JM, Blosser RL, Fan H, Wang H, Luber BS, Zhang M, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B, Sears CL, Anders RA, Pardoll DM, Housseau F. The

vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints. Cancer Discov 2015; 5: 43-51. DOI:10.1158/2159-8290.CD-14-0863.

7) Prall F, Huhns M. PD-L1 expression in tumour buds of colorectal carcinoma. Histopathology 2016; 69: 158-160. DOI: 10.1111/his.12915.

8) Kim JH, Park HE, Cho NY, Lee HS, Kang GH. Characterisation of PD-L1-positive subsets of microsatellite-unstable colorectal cancers. Br J Cancer 2016; 115: 490-496. DOI: 10.1038/bjc.2016.211.

9) Alsuliman A, Colak D, Al-Harazi O, Fitwi H, Tulbah A, Al-Tweigeri T, Al-Alwan M, Ghebeh H. Bidirectional crosstalk between PD-L1 expression and epithelial to mesenchymal transition: significance in claudin-low breast cancer cells. Mol Cancer 2015; 14: 149. DOI: 10.1186/s12943-015-0421-2.

10) Tsutsumi S, Saeki H, Nakashima Y, Ito S, Oki E, Morita M, Oda Y, Okano S, Maehara Y. PD-L1 expression at tumor invasive front is associated with EMT and poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. Cancer Sci 2017; 108: 1119-1127. DOI: 10.1111/cas.13237.